

· 成果简介 ·

胰岛素分子正确结构的形成和 蛋白质二硫键异构酶

邹承鲁* 王志珍 唐建国 胡朝红 余宣传

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

[关键词] 胰岛素, 二硫键, 蛋白质二硫键异构酶

50年代国外文献一致认为,从分开的A,B链不可能再重组成胰岛素分子。但邹承鲁等“胰岛素还原型A,B链可以重组成天然胰岛素分子”的发现,确定了60年代中国人工合成牛胰岛素的路线,并获得成功。80年代初,美国最先用基因工程生产人胰岛素仍然沿用这条路线,说明该发现是经得住考验的,但是重组的理论基础在国内外却一直没有被研究。对此我们提出一个假说,我们认为:胰岛素两条肽链之间应该存在相互作用和正确识别,才使链间的二硫键有正确的配对;在所有的重组产物中,天然胰岛素的结构最稳定,因此胰岛素重组的产率才可能大大高于随机重组的几率。为此,必需在实验上给予充分的令人信服的证据。本项目用核磁共振、圆二色谱、付立叶变换红外光谱、紫外差吸收光谱、荧光光谱、溶剂微扰等多种生物大分子溶液构象研究技术,以及胰岛素化学修饰、重组产物的HPLC分析、受体结合和生物活性测定,在实验上较全面地、从多方位进行证明。首先,发现还原的胰岛素的A,B链分开后仍然含有一定的有序二级结构,这是它们发生相互作用的结构基础;并指出文献中未能发现有序结构是由于过量还原剂存在引起的变性作用。进而我们证明了A,B链之间确实存在着侧链基团的广泛的、相当强烈的慢相互作用,并涉及整条肽链的构象调整。正由于这种相当强烈的相互作用,即使在8M脲溶液的强变性条件下,A,B链仍然能以比理论计算几率高的产率重组。我们还通过A链N-端和B链C-端的化学修饰研究各种结构因素在两条链相互作用中的作用表明,B链C端不但对生物活力,而且对A,B链重组都是十分重要的。虽然A1被D-型氨基酸取代对活力影响不大,但是无论D-型还是L-型氨基酸的取代都严重阻碍A,B链间的相互识别。所有这些导致链间的相互识别和相应巯基的正确配对,然后通过氧化形成天然二硫键,最终形成胰岛素分子特定的空间结构并获得生物活性。本项目进一步发展了中国人工全合成胰岛素的科学成就,阐明了人工合成胰岛素中A,B链重组成功的理论基础。

关于胰岛素分子的结构,国际上许多权威人士,包括诺贝尔奖获得者 Anfinsen,认为是一种亚稳态,这使大部分国际流行的生化教科书也持有这一观点,声称从A,B链重组胰岛素的产率相当于计算的几率(约8%),因此前体分子中的连接肽(C肽)是正确结构形成所必需的。

* 中国科学院院士。

本文于1996年4月11日收到。

但我们发现他们所用的公式不能用于含有两条肽链的胰岛素,因此他们对几率的计算是错误的。我们导出了 $A_n B_n$ 重组产率计算的一般公式。考虑到两条链各自的、相互的、各种结合的可能性,按我们的计算,分开的A链和B链随机重组有正确结构的胰岛素的几率接近于零。然而在我们找到的适当条件下,天然胰岛素的重组产率达30%—50%,远远高于计算的几率。因此我们比较研究蛋白质二硫键异构酶催化二硫键错接的胰岛素、交联胰岛素和人胰岛素原,以及S-磺酸型的A、B链、交联胰岛素和人胰岛素原,生成天然二硫键的规律。其间,我们在国际上首次用蛋白质二硫键异构酶在同一基因编码的二条肽链的重组上获得成功。S-磺酸型的化学交联胰岛素和人胰岛素原经蛋白质二硫键异构酶的催化,以相似的高产率(95%)得到天然结构,大大高于文献值(25%);加入C肽对A、B链重组并没有影响,这强有力地说明C肽不提供结构信息,只起连接A、B链的作用;人为的小分子交联剂也起到C肽类似的作用。综合这些结果,揭示了胰岛素A、B链本身已经含有形成天然分子结构信息的本质;进一步强调C肽并不含有结构信息,而只起连接A、B链的作用。该新的见解发表在《Trends in Biochem. Sci. (TIBS)》上,纠正了国外大部分教科书中关于“胰岛素原的C肽是胰岛素分子中正确二硫键形成所必需”的错误观点。TIBS是专门刊登生物化学领域内新成就、新观点等综述文章的一流杂志,是本领域发行量最高的刊物,一般不接受自由投稿而是由编者约稿,它的impact factor高达15.788(中国科学B辑为0.288)。

在研究二硫键在蛋白质分子,包括胰岛素分子结构中的重要性的基础上,我们又进一步研究二硫键对胰岛素发挥激素生物功能的作用。通过用巯基还原剂、氧化剂以及化学修饰剂定量研究小鼠肝膜和人胎盘膜巯基含量和与胰岛素受体特异结合的关系,发现蛋白质分子中半胱氨酸之间的二硫键不但对分子结构的形成和维系有重要作用,而且它们的位置、状态和性质也会影响分子的生物活性,和巯基之间的交换反应还是蛋白质发挥生物功能的一种途径。这一研究结果为胰岛素和其受体通过巯基-二硫键交换发挥生物功能的作用机制提供了新的证据。

最近发现,蛋白质二硫键异构酶是与新生肽折叠密切有关的仅有的二个“折叠酶”中的一个,是最终全面阐明中心法则的一个关键问题,具有极其重大的生物学基础理论意义,并对基因工程产物的后加工又有肯定的实用价值。但国际上对该酶结构、功能和作用机制的研究还非常少,因此该研究课题具有强烈的竞争性。除了用蛋白质二硫键异构酶研究胰岛素分子正确结构的形成外,我们还开展了对该酶的系统研究:简化测活方法,提高了灵敏度;最早报道了按权威性的“酶学方法”制备的酶制剂的不均一性,存在二体和四体不同聚合状态的慢平衡,亚基间主要是氢键,疏水和离子相互作用,二体的比活是四体的一倍;发现在反应过程中生成酶与底物以二硫键共价结合的中间物,为酶的作用机制提供了重要信息,这一研究论文发表后迅速被《Current opinion in structural biology》(1991年才出版的生物学权威性评论杂志)评为这一领域的重要论文;我们还发现酶活性部位的二硫键不是活力所必需,完全还原的酶活力最高;蛋白质二硫键异构酶是位于内质网管腔内含量极高的酶,催化在这里加工的各种蛋白质的二硫键的生成。我们在体外检验这个设想,发现酶可以同时催化两种含有错接二硫键的蛋白质分子互不干扰地生成正确二硫键,为该酶在体内行使生物功能提供合理模型;在我们找到的优化条件下,用二硫键异构酶催化磺酸型胰岛素原已接近定量产率形成天然二硫键的结果,不但为揭示胰岛素分子的结构本质提供全新的认识,而且对提高基因工程生产胰岛素或提高其他含二硫键的蛋白的产率提供一个非常有实用价值的途径。

我们旨在阐明胰岛素分子正确结构形成机理的“胰岛素 A、B 链在溶液中的相互作用”的研究课题,得到国家自然科学基金重大项目支持,并连续获得 1984—1990 年期间美国国立卫生院(NIH)二期国外研究基金。该基金的发放十分严格,要通过三个层次的科学评议,特别是要有申请项目在国外进行比在美国任一实验室更为有利的充分根据。当时 NIH 的国外基金发放正处下降,对第三世界科学家来说还存在一定的歧视。我们的课题并不是以中国特有的实验材料或环境作为优势,而是以课题本身的生物学意义、科学思想的创新性、实验路线的合理可行以及我们在这项研究上的科学基础相对美国同行更具有优势而取得竞争成功的。

该项目的研究思想、研究路线以及所总结出的规律认识是基于我们中国人自己的科学成就。研究结果已总结成数十篇论文,都发表在国内外核心杂志上,特别是发表在《TIBS》,《Biochemistry》,《BJ》,《FEBS》,《BBA》以及《中国科学》等杂志上的工作,已被国际同行多次引用。该研究又为我们研究蛋白质和新生肽链的折叠奠定了基础。本工作获 1995 年国家自然科学基金二等奖。

THE FORMATION OF NATIVE STRUCTURE OF INSULIN MOLECULE AND PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE

Zou Chenglu Wang Zhizhen Tang Jianguo

Hu Chaohong Yu Xuanchuan

(*Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101*)

Key words insulin, disulfide bond, protein disulfide isomerase

国家自然科学基金会代表团访问斯洛文尼亚和波兰

1996 年 4 月 6—16 日,张新时副主任率我委员会代表团访问了斯洛文尼亚及波兰。访斯期间,代表团访问了斯洛文尼亚科学基金会,与其主席及学术委员会主任等领导进行了友好的建设性的会谈,4 月 10 日斯洛文尼亚科技部长会见了代表团,双方签署了两组织间的科学合作谅解备忘录,斯科技部副部长、我国驻斯大使鲁培新及经济参赞张银锡等出席了签字仪式。签字仪式后,举行了记者招待会。张新时先生就我国科技发展政策,我委员会同国外基金组织之间的关系等,回答了记者们的提问。在访斯期间,代表团还访问了 Jozet Stefan 研究所、地质研究所、生物研究所等科研机构,与有关方面的科学家进行了广泛而有益的接触。

在访问斯洛文尼亚后,代表团又前往波兰访问了波兰科学基金会,波兰科学技术委员会,华沙大学,波兰果树研究所等科学机构。波兰科技委副主任,国务秘书 Jan K. Frackowiak 博士及波兰科学基金会主席 M. W. Grabski 教授分别会见了代表团。会谈中,双方都表达了对今后开展科学合作的诚挚的迫切的愿望,探讨了在中波政府间科技合作总枢架下我委员会与波兰科技委之间签署合作备忘录的可能性。张新时副主任还代表我委员会邀请波科技委副主任 Frackowiak 博士今年 9 月访华,届时将进一步讨论今后两组织间的合作问题。

(国际合作局 陈淮 供稿)